

19  
File  
(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

**特開平8-176193**

(43)公開日 平成8年(1996)7月9日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/47	Z NA	8318-4H		
A 61 K 38/00	AAM			
		A 61 K 37/02	AAM	

**審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全7頁)**

(21)出願番号	特願平6-336143	(71)出願人 392033288 株式会社そせい 東京都文京区後楽1丁目1番10号
(22)出願日	平成6年(1994)12月23日	(72)発明者 御子柴 克彦 東京都三鷹市井の頭2-19-25 (74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 長期増強誘導性ペプチド

(57)【要約】

【目的】 シナプス伝達効率の長期増強誘導作用を有するペプチド及びその用途を提供することを目的とする。

【構成】 本発明のペプチドは特定のアミノ酸配列を有し、シナプス伝達効率の長期増強誘導作用を有する。本発明のペプチドは上記の作用を有するので、脳の機能探索研究に有用であり、また老人性痴呆などの記憶障害をもたらす疾患の診断薬、治療薬などとしても有用である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で示されるアミノ酸配列よりなるペプチド及びその塩。

【請求項2】 配列番号1で示されるアミノ酸配列よりなるペプチド又はその塩を有効成分とするシナプス伝達効率の長期増強誘導剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は長期増強誘導性ペプチド及びその用途に関する。より詳細には、シナプス伝達効率の長期増強(Long term potentiation; LTP)誘導作用を有するペプチド及び当該ペプチドを有効成分として含有するシナプス伝達効率の長期増強誘導剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】動物の脳の性質の一つに脳の可塑性とよばれる性質があることが知られている。即ち、動物が学習・記憶をする際、一時的な経験により脳の機能状態が長期間にわたり持続的に変化しうるのはこの脳の可塑性によるというものである。その脳の可塑的変化には大別して2種のタイプがあり、シナプス発芽に代表されるシナプス結合の形態的変化と長期増強に代表されるシナプス伝達の機能的変化があることが分かってきている。いずれの場合でも、脳の神経細胞と神経細胞のつなぎめであるシナプスに明確な可塑性があることから、このシナプスにおける可塑性が記憶や学習の基礎過程を担っていることが類推されている。上記の如きシナプス伝達の機能的変化である長期増強は、入力纖維の高頻度電気刺激によりシナプスの伝達効率が長期にわたって増強する現象であり、記憶や学習と深く関連している可能性があるため現在種々の実験が行われており、非常に注目されている現象である。

【0003】上記の長期増強が注目される理由としては、以下の実験事実が挙げられる。まず、長期増強は哺乳動物で記憶に最も関与しているといわれる海馬体で起こる。次に長期増強の発生を選択的に阻害する薬剤がある種の学習を阻害すること、動物の脳に刺激電極を刺入し高頻度刺激を与え人工的に長期増強を起こしておくとその動物の学習能力に影響がみられること、ある種の学習形成に伴って動物にシナプス伝達効率の持続的な上昇がみられること、老化により学習能力と長期増強が平行して障害されることなどが挙げられる。これらのこととは、例えば、実験医学8; No. 12 (1990) 50-55頁に詳述されている。

【0004】上述したように、長期増強もしくは長期増強様の現象は、一般的には高頻度の電気刺激により発生することが知られているが、一方では、電気刺激に限らず、ある種の物質を投与することによっても誘導されることも知られている(Neuroscience Lett 91; 101-105, 1988)。このような物質の代表として、種々な神経伝達物

2

質が挙げられるが、最近までよく知られている神経伝達物質としてグルタミン酸がある。グルタミン酸は、動物の大脳皮質における主要な興奮性伝達物質であるとされ、このグルタミン酸に対する受容体は薬理的には3種類に分かれる。即ち、KA (Kainate)、AMPA ( $\gamma$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate) 及びNMDA (N-Methyl-D-aspartate)受容体の3種類である。このうち、NMDA受容体は近年、上述のシナプスの可塑性への関与が高い物質としてよく研究されている。その受容体に関しての刺激もしくは拮抗剤も鋭意研究が進んできており、一部は既に医薬品としての開発の途上にあるものもある。

【0005】また、これらの物質のほかにシナプス伝達効率の長期増強を起こす物質として、ハチ毒MCD (Mast Cell Degranulating)ペプチド等も見出されている(NATURE 328; 70-73, 1987)。上記のMCDペプチドは、22個のアミノ酸残基からなる非常に塩基性の高いペプチドであり、2個のS-S結合で固定されたヘリックスをもつことが明らかになっている(Neurochem International 18; 525-534, 1991)。また、MCDペプチドに関する研究として、従来までに、MCDペプチドによる長期増強誘導経路として、上述した興奮性アミノ酸であるNMDA (N-Methyl-D-aspartate)の受容体を介さずに長期増強を誘導することが明らかになっている(生物物理 30; 22-27, 1990、実験医学 8; 1546-1552, 1990)。また、その作用機序としてラット脳内にはMCDの高親和性結合部位が存在すること(J. Biol. Chem. 259; 13957-13967, 1984)及び脳内のある種の電位依存性K (カリウム) チャンネルと結合し、そのもの自体でカチオン選択性の電位依存性チャンネルを作ること、また肥満細胞のG蛋白を活性化させるなどの特徴が明らかになっており、これらは例え、雑誌「神経研究の進歩」35巻第4号591-599頁に詳述されている。一方、上述のMCDペプチドの高親和性結合部位に関しても、近年、分子量75000と37000のサブユニットからなる蛋白質であることが明らかになっている(Biochem J 257; 899-903, 1989)。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、MCDペプチドはシナプス伝達効率の長期増強を起こす物質として知られており、脳の長期増強作用を研究する上で極めて有用であり、ひいては動物の記憶のメカニズムに関与する研究上重要な物質である。しかしながら、本物質はハチ毒の一種であり、一般的には脳血管閥門を通りにくいといわれているものなので、本来脳内における生理作用は意義のないものと考えられてきた。しかし、動物の脳内には、内在的にMCDペプチド抗体と免疫学的に交差する物質の存在することが明らかになっており(NATURE 328; 70-73, 1987)、この内在性物質が長期増強誘導に深く関与している可能性がある。このように、脳内

にはシナプス伝達効率の長期増強を起こす物質が存在しており、この内在性物質を精製・単離することができれば、この内在性物質を用いて記憶に関する種々の現象を研究する有力な手段を供することができる。また、昨今問題となっている老人性痴呆（脳血管性、アルツハイマー）に対する有効な診断試薬、ひいては予防薬・治療薬として利用できる可能性もある。しかしながら、この内在性物質は、動物の脳内に微量しかないので、その精製・単離は至難であり、その単離・精製及び構造決定に成功したとの報告はされていない。本発明者等は、従来よりマウス、ラットの脳組織粗抽出液中に上記MCDペプチド類似物質が存在することを報告しているが、本発明はこれらの研究をさらに進展させた結果、シナプス伝達効率の長期増強を誘導し得るペプチドの単離・精製及び当該ペプチドのアミノ酸配列の決定に成功した。本発明はかかる知見に基づいてなされたもので、本発明の目的はシナプス伝達効率の長期増強を誘導し得るペプチド及びその用途を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するためになされた本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列よりなるペプチド及びその塩並びに当該ペプチド又はその塩を有効成分とするシナプス伝達効率の長期増強誘導剤である。なお、本発明のペプチドは機能性食品としても利用することができる。

【0008】本発明のペプチドは生体組織内に内在しており、哺乳動物の脳又は他の臓器・組織・液などから単離することもできるが、通常、有機化学的な合成方法によりアミノ酸を段階的に導入する方法により合成することができる。また、遺伝子工学的により製造することも可能である。

【0009】生体組織から得る場合、原料となる生体組織としては、本発明の目的物を含有する限り限定されないが、特にラット、マウス、ウシ、ブタ、ヒツジなどの哺乳動物の脳から効率よく、しかも高収率で得ることができるので好適に用いられる。上記の原料からの本発明のペプチドの精製・単離は、一般的に蛋白質の分離・精製に用いられる各種方法、例えば、塩析、遠心分離、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル汎過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、限外汎過、凍結乾燥などの方法を用いることにより行うことができる。特に好適には、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル汎過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーから選ばれた少なくとも一種、好ましくはこれらを適宜組み合わせることにより実施される。

【0010】特に好ましい操作の一例としては、原料、例えば、マウスなどの哺乳動物の正常脳組織を摘出し、加熱処理した後、酸性条件下にホモジナイズし、一般

的な遠心分離を行い、その沈殿画分に塩酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸等を加えた後再度ホモジナイズし、遠心分離を実施する。その上清について更に遠心分離を行い、得られた上清を凍結乾燥し、エーテル等で洗浄後、通常の透析処理を施す。こうして得られた抽出物をセファデックスカラム、続いて、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを組み合わせて精製することにより目的とするペプチドを精製・単離することができる。なお、これらの精製に用いたカラム、溶出液などは、分離能に優れるものであれば後記実施例で使用したものに限定されるものではない。

【0011】本発明のペプチドを有機化学的な合成方法によりアミノ酸を段階的に導入して製造する場合、当該方法としては固相ペプチド合成又は液相ペプチド合成法が知られており、例えば泉屋信夫他著「ペプチド合成の基礎と実験」丸善発行などに詳細に記載されている。液相ペプチド合成では、C末端に位置すべきアミノ酸のカルボキシル基をベンジル基(BzI)、t-ブチル基(t-Bu)等で保護し、C末端から2番目に位置すべきアミノ酸のアミノ基をt-ブチルオキシカルボニル基(Boc)、ベンジルオキシカルボニル基(Z)等で保護し、これらをジメチルホルムアミド(DMF)等の適当な溶媒に溶解し、ジシクロヘキシカルボジイミド(DCC)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)の存在下4°Cで18時間程度反応させる。ついで、生成物のアミノ保護基を常法（トリフルオロ酢酸などによる）により除去し、得られるジペプチドを第3のアミノ酸（これもアミノ基を保護してある）とともに上記と同様にして反応させる。更に、同様な手順を繰り返して順次必要なアミノ酸を結合させ、保護基の結合した状態の目的ペプチドを得る。なお、反応させるアミノ酸が側鎖官能基を有する場合にはペプチド合成反応に先だって保護する必要がある。例えば、グルタミン酸の $\alpha$ -カルボキシル基はベンジルエステル(OBzI)などにより、アルギニンの $\epsilon$ -アミノ基はトシリ基(Tos)などにより保護する。最終反応の終了後、これらの保護基を接触還元やフッ化水素(HF)などにより除去し、目的とするペプチドを得ることができる。

【0012】一方、固相ペプチド合成については、ペプチドシンセサイザー（例えば、アプライドバイオシステムズ社製430A型）を用いて行うことができる。この方法においては、目的とするペプチドのC末端アミノ酸が結合したフェニルアセトアミドメチル(PAM)樹脂、即ちアミノ酸-OCH<sub>2</sub>-PAMのN側にBoc基で保護したアミノ酸を自動制御により逐次結合させ、目的とするペプチドに保護基とPAM樹脂の結合した試料を得ることが出来る。次いで、この試料にアソールなどのスカベンジャーを添加した後、HFを導入し-2°C、1時間反応させることにより目的ペプチドを遊離させることができる。遊離したペプチドは無水エーテルなどで洗浄後、酢酸を含む水で抽

出、凍結乾燥後更に、高速液体クロマトグラフィーにより精製、減圧乾燥することにより粉末として得ることができる。

【0013】本発明のペプチドは遺伝子工学的方法によつても得ることができ、例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードするDNA断片を合成し、このDNA断片を常法により適当な発現ベクターに組み込み、この発現ベクターで適当な宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、その培養物から単離・精製することにより、目的ペプチドを調製することができる。なお、機能性食品に供することを目的として、細菌及び／又は酵母を宿主として発現した場合には、培養物から本発明のペプチドを単離・精製して使用する以外に、細菌及び／又は酵母の死菌又はその粉末をそのまま使用してもよい。

【0014】本発明のペプチドは上述の方法により得ることができるが、得られた本発明のペプチドは、必要に応じて、限外済過膜、ゲル済過、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)など慣用の手段に付して更に精製してもよい。なお、本発明のペプチドは糖鎖を含むものであつてもよく、またN末端及び／又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が付加してもよい。

【0015】本発明のペプチドの塩としては、酸付加塩及び塩基付加塩が含まれ、酸付加塩としては、製薬上許容される酸(無機酸及び有機酸)との塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、シウ酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等が例示される。また、塩基付加塩としては、製薬上許容される塩基(無機塩基及び有機塩基)との塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アルミニウム塩等の無機塩基との塩、塩基性アミノ酸(例えばアルギニン、リジン等)との塩などが例示される。本発明のペプチドの塩は、常法に準じて、当該ペプチドに酸又は塩基を付加させることにより調製することができる。

【0016】本発明の長期増強誘導剤は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチド及びその塩の少なくとも1種を有効成分として含有することからなり、当該ペプチド単独又は通常少なくとも1つの製薬補助剤とともに一般的な医薬製剤の形態に調剤され、非経口的(即ち、静脈注射、直腸投与等)又は経口的に投与される。かかる医薬製剤としては各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとして錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、坐剤、軟・硬カプセル剤、注射剤(液剤、懸濁剤等)などが挙げられる。これらの製剤は、通常、賦形剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、界面活性剤、吸着剤、滑沢剤などの担体を用いて、

慣用の製剤化手段にて調製することができる。

【0017】本発明の医薬製剤中に含有されるべき本ペプチド又はその塩の量は、特に限定されず広範囲に選択されるが、通常、全組成物中、5～100%、特に10～70%が適当である。本発明の医薬製剤の投与方法は特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じた方法で投与される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤の場合には経口投与される。また注射剤の場合には単独あるいはブドウ糖、アミノ酸などの通常の補液と混合して静脈内投与され、さらには必要に応じて筋肉内、皮内、皮下、腹腔内又は脳内投与される。本発明の医薬製剤の投与量は、用法、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などにより適宜選択される。

【0018】本発明のペプチドを機能性食品として利用する場合、当該食品は配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩を含有することからなり、そのまま、又は種々の栄養分を加えて、若しくは飲食品中に含有せしめて、痴呆症などの治療・予防を目的とする機能性食品(又は食品素材)として食される。例えば、上述した適当な助剤を添加した後、慣用の手段を用いて、食用に適した形態、例えば、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形して食用に供してもよく、また種々の食品(例えば、ハム、ソーセージ等の肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の水産加工食品、バター、粉乳等の乳製品、パン、菓子など)に添加して使用されたり、水、果汁、牛乳、清涼飲料等の飲物に添加して使用してもよい。かかる機能性食品の形態における本願ペプチドの摂取量は、年齢、体重、症状、疾患の程度、食品の形態等により、適宜選択・決定することができる。

#### 【0019】

【発明の効果】本発明のペプチドは、ヒトをはじめとする動物における脳の機能探索研究に非常に有用な手段を供するもので、特に脳における記憶のメカニズム研究にとっては図りしれない恩恵を供することになる。また、前述のような記憶障害をもたらす疾患に対する診断薬、予防・治療薬などとしても有用である。さらに、上記の疾患の免疫学的診断法を確立する上での抗原などとしても有用である。また、本発明の長期増強誘導剤によれば、シナプス伝達効率の長期増強を誘導することができる、老人性痴呆症(脳血管性、アルツハイマー等)などの予防・治療に利用することができる。

#### 【0020】

【実施例】以下、参考例、実施例及び試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

#### 【0021】参考例1

##### 結合活性測定法

50 まず、<sup>125</sup>I-MCD及び脳膜(brain membrane)を文献

(Neurosci. Res., 8; 147-157, 1990)に記載の方法により調製した。脳膜に対する結合活性の測定は上記文献に記載の方法に準じて、 $^{125}\text{I}-\text{MCD}$ の脳膜に対する結合を遠心法で測定することにより行った。即ち、脳膜を4.0~5.0  $\mu\text{M}$   $^{125}\text{I}-\text{MCD}$  (5.0  $\mu\text{l}$ )と4°C、30分間、結合緩衝液中でインキュベートした。結合緩衝液は、1.0 mg/mlの化合物48/80 (シグマ社製)及び1 mg/mlのBSAを含有する2.0 mMトリス-HCl、pH 7.4、1.40 mM NaCl、5 mM KCl、2.8 mM CaCl<sub>2</sub>、1.3 mM MgSO<sub>4</sub>からなる。競合的結合実験は、 $^{125}\text{I}-\text{MCD}$ を添加する15分前に、適当な濃度の非ラベル化MCD又は試験ペプチドを添加することにより行った。インキュベーション後、混合物は、4°C、15,000  $\times g$ で5分間遠心分離した。次いで、上清を除去し、ペレットを同じ緩衝液で2回洗浄した後、放射活性を直接測定した。

#### 【0022】実施例1

##### 本発明ペプチドの精製及び構造決定

以下の手順に基づき、目的とするペプチドの精製・単離を行った。まず、正常なマウスの脳を摘出し、小脳を除いた後、細断した。得られた脳組織を4倍量の蒸留水中、95°C以上で10分間煮沸した。4°Cまで冷却した後、濃度1Mとなるように酢酸を加え、ポリトロンを用いて4°Cで1分間ホモジナイズした。次に、このホモジネートを6000 rpmで40分間遠心し、上清を除去した。

【0023】こうして得られた沈殿部分に、4倍量の9%の塩酸と5%のギ酸及び1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を4°Cで加えて、ホモジナイズし、これを再び6000 rpmで40分間遠心分離した。次に、得られた上清を、4°CにてNaOHを用いてpHを7.5に調整し、エーテル洗浄を3回行うことにより脱脂した。その後、水性抽出液中のエーテルを除去するため、30分間、30°C、減圧下にエバボレーションを行った。抽出液は、分子量1000以下の物質を除去するため、スペクトラボーラー6 (Spectrapor6)透析チューブを用いて2日間蒸留水に対して透析した。透析物は凍結乾燥し、得られた粉末は蒸留水に懸濁させた。

【0024】次に、上記の方法で得られた懸濁液を、SPセファデックスC-25 (SPC-25、ファルマシア社製)カラムクロマトグラフィー (30 x 100 mm)に付した。即ち、SPC-25ゲルを2.0 mM 酢酸アンモニウム(pH 5.0)で平衡化し、上記の脳抽出物をカラムに付した後、カラムを5倍カラム量の2.0 mM 酢酸アンモニウム(pH 5.0)で洗浄した。次いで、0.2M 酢酸アンモニウム(pH 7.0)、0.7、1.2及び2M 酢酸アンモニウム(pH 7.5)を溶出液として用いて溶出した (各ステップ: 5倍カラム量)。各ステップからの溶出画分は凍結乾燥して酢酸アンモニウムを除去した。各画分は、前記の結合活性測定

法で検定した。その結果、MCDペプチド様の活性を有する画分は、1. 2M 酢酸アンモニウム(pH 7.5)溶出画分であることが判明した。

【0025】上記の活性画分は、C18逆相HPLC (19 x 150mm, μBondasphere 5 μC18-100 Å, Waters社製)を用いて精製した。即ち、上記のSPC-25カラム溶出活性画分を、予め0.1%TFA水溶液で平衡化したカラムに付した。カラムからの溶出は、5%から35%リニアグラジェントのアセトニトリル溶液と0.1%のTFA溶液の混合溶液を用いて毎分5 mlの流量で60分間溶出し、220 nmの吸光度をモニターした。グラジェントの最後において、50%のアセトニトリル溶液と0.1%のTFA溶液の混合溶液を用いて、溶出を20分間行った。なお、溶出液は2.0 mlずつ集めた。すべての溶出液は凍結乾燥し、結合活性測定の直前に蒸留水に溶解し、結合活性を測定した。結合活性を有するC18逆相HPLC溶出画分は、陽イオン交換樹脂 (TSKSP-5 PW、東ソー社製)が充填された陽イオン交換カラム (7.5 x 750 mm)に付して更に精製した。この際の溶出条件は、0から1.5 Mリニアグラジェントの食塩水及び5.0 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.4)の混合溶液にて、毎分1 mlの流速で溶出した。溶出液は1 mlずつ集めた。

【0026】SP-5 PWカラムから溶出した活性画分は、更にC18逆相HPLC (4.6 x 100 mm, ODS-AM, S-3 μ, 120 Å, YMC-PAC)に付して精製した。溶出は、5から35%リニアグラジェントのアセトニトリル溶液と0.1%のトリフルオロ酢酸溶液との混合溶液を用い、毎分1 mlの流量で30分間溶出し、220 nmの吸光度をモニターした。溶出液は1 mlずつ集め、凍結乾燥し、結合活性測定直前に蒸留水に溶解し、結合活性を測定した。上記の溶出パターンを図1に示す。図1において、点線はアセトニトリル濃度(%)、実線は220 nmにおける吸光度、棒グラフは結合活性を示し、横軸は溶出時間 (フラクション番号)を示す。図1に示されるように、220 nmの吸光度でモニターされる主ピークに対応する画分20が強い結合活性を有することが明らかになった。

【0027】かくして得られた画分20について、気相ペプチドシーケンサーにより分析した。その結果、当該ペプチドは配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることが判明した。配列番号1のアミノ酸配列に示されるように、本発明のペプチドはMCDペプチドとは異なる配列を有するペプチドである。従って、本願ペプチドは、MCDペプチドと異なる部位でMCD-受容体と結合していることが推察される。

#### 【0028】実施例2

##### 本発明ペプチドの化学合成

常法に準じ、固相合成法により本発明のペプチドを合成した。即ち、アプライド・バイオシステムズ社製ペプチ

ド合成装置(430A型)に、Arg化固相樹脂及び配列番号1に示されるアミノ酸配列に基づいて必要となるアミノ酸カートリッジを装填し、DCCによる無水対称法により、ペプチド合成を行った。次に、ペプチド研究所製フッ化水素装置に上記合成ペプチド樹脂を導入し、アニソールを添加後、フッ化水素を導入した。-2°C、1時間の反応後、フッ化水素を減圧下に除去し、ペプチドを無水エーテル、クロロホルムで交互に3回洗浄し、2N酢酸にペプチドを溶解させ、凍結乾燥した。この方法により、目的とするペプチドを得た。更に、本ペプチドはHPLCにより精製した。なお、合成したペプチドは、6N塩酸110°C24時間の加水分解後、日立835型アミノ酸分析装置によりアミノ酸分析を行うことにより、更に、日本電子製HX-110型質量分析装置によるFAB-MS法で構造を確認した。合成したペプチドのHPLCによる保持時間は、脳から精製したペプチドの保持時間と一致した。

【0029】試験例1

### 長期增強誘導作用試驗

本発明のペプチドの長期増強誘導作用を、文献(Neurosci Res. 8: 147-157, 1990)に記載の方法に準じて行った。即ち、モルモットの海馬スライス(500  $\mu$ m)を作製し、30°Cの灌流装置に固定した。刺激電極をシャーファー側枝(Schaffer collaterals)が通っている放線層(stratum radiatum)領域に刺し、CA1領域の錐体\*

配列

Lys	Val	His	Gly	Ser	Leu	Ala	Arg	Ala	Gly	Lys	Val	Arg	Gly	Gln
							5				10			15
Thr	Pro	Lys	Val	Ala	Lys	Gln	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Thr	Gly	
								20		25			30	
Arg	Ala	Lys	Arg	Arg	Met	Gln	Tyr	Asn	Arg	Arg				
								35		40				

### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のペプチドの逆相クロマトグラフィーにおける溶出パターンを示す図である。

【図2】試験例1における長期増強誘導作用試験の概略※

\* 細胞層とその樹状突起のある領域に記録電極を配置した。前者の記録電極により集合活動電位とそのピーク潜時(latency)を、後者により集合EPSPの傾きを測定した。本試験系の概略を図2に示す。刺激電極を通してテスト刺激を行うと、刺激の強さに応じて集合活動電位が増大し、あるレベルで飽和してしまう。その最大値の半分の値の集合活動電位を発生させるように、テスト刺激の強さを設定した。次いで、灌流液中に、本発明のペプチド(濃度: 20 μM)を加え、5分間灌流し、その後、再び元の灌流液に戻した。試験結果を図3に示す。なお、図3において、黒バーは本発明のペプチドを含む灌流液による処理を示す。図3に示されるように、本発明のペプチドを添加すると、すみやかに集合活動電位が増大し、そして計測期間中ずっと持続した。このことから、本発明のペプチドは、海馬スライスのCA1領域において、シナプス伝達効率の長期増強作用を誘導することが確認された。

(0030)

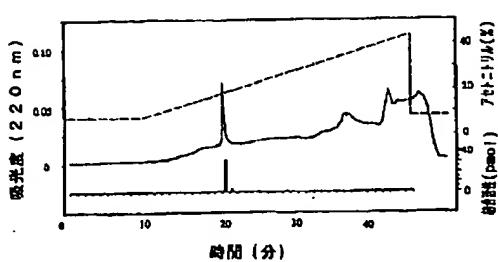
### 【配列表】

20 配列番号：1  
配列の長さ：41  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

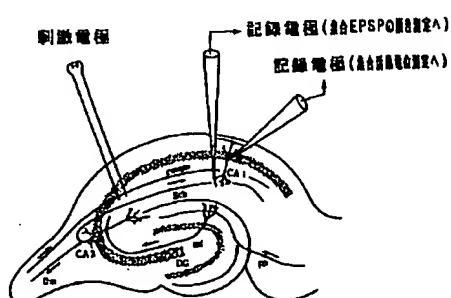
※を示す図である

### 【図3】本発明のペプチドの長期増強誘導作用を示す図である

[图11]



[图2]



【図3】

